

A circle of improvement in bleeding management : from laboratory to clinic and back

Citation for published version (APA):

Lance, M. D. (2013). *A circle of improvement in bleeding management : from laboratory to clinic and back*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20130517ml>

Document status and date:

Published: 01/01/2013

DOI:

[10.26481/dis.20130517ml](https://doi.org/10.26481/dis.20130517ml)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 05 May. 2023

Summary

Chapter 1 gives a historical overview of major discoveries in the hemostasis field on the laboratory testing of coagulation and platelet function. In the present thesis we have used three different types of hemostatic screening tests (with plasma or whole blood) to predict hemostatic insufficiencies and to monitor the risk of acquired bleeding. The first category consists of screening tests for *plasmatic coagulation kinetics*: the prothrombin time, the activated partial thromboplastin time, and kinetic analysis of thrombin generation. Both types of coagulation times were developed in the past during research on coagulation mechanisms. After later standardization, these tests are worldwide used to screen for single or multiple coagulation factor deficiencies, and for monitoring therapeutic anticoagulation with vitamin K antagonists or unfractionated heparin. The first steps towards thrombin generation tests were already set in 1953. Current methods adequately measure the total amount of thrombin generated in coagulating plasma. However, this technique still needs (pre-)analytical standardisation before common use in clinical practice. The second category of screening tests aims to measure the *coagulation capacity of whole blood by means of visco-elasticity assessment of fibrin clot formation*. Tests in use are the thromboelastography (TEG) and rotational thromboelastometry (ROTEM). The first description of a whole blood visco-elastic test was published in 1948. The method has seen a recent revival, and is currently popular as a fast point-of-care test to monitor bleeding patients. A third relevant group of tests evaluates *platelet function analysis* in plasma or blood. This includes the platelet function analyzer PFA-100, and multiple electrode impedance aggregometry (MEA). Such rapid tests are important due to the growing number of patients on platelet-inhibiting drugs.

The overall **aim** of this thesis was to come to a better performance of the circle of quality improvement in bleeding management in the hospital. This quality improvement relies on close collaboration between caregivers and the hospital laboratory, in order to continuously ameliorate the treatment of hemorrhagic patients. To achieve this goal, we investigated how the above mentioned laboratory tests can be used to improve diagnostics in hemostatic control of a given patient, and can help to develop a patient-tailored therapy plan, to stop peri-operative bleeding earlier.

Chapter 2 concentrates on the precise analytical conditions for measurement of the mean platelet volume (MPV). This is relevant since multiple papers consider the MPV as a proxy marker of platelet reactivity and an independent risk factor for

cardiovascular disease. This presumes a thorough control of the pre-analytical variability of this parameter, and points to a need for good pre-analytical standards. **Chapter 2a** consists of a review, which stresses the high variability in literature results describing MPV as a marker of platelet function in cardiovascular disease. It further provides an in-depth survey of the methods for MPV measurement and their drawbacks. Several authors have reported that MPV values are dependent on the type of anticoagulant and the time-to-measurement. Hence, a standardization of laboratory methods for this blood parameter is essential. A well-performing, automated assay is the impedance method, used to measure blood cell counts, which also gives routine information on MPV. A possible approach to standardization of this parameter is proposed.

The study of **chapter 2b** aimed to achieve such standardization. Blood from 20 healthy volunteers was collected into tubes containing potassium EDTA or sodium citrate. Platelet count and MPV were determined in the blood samples every half hour. Citrate-anticoagulated samples gave a significantly lower MPV than EDTA-anticoagulated samples. The MPV values furthermore increased during two hours in the presence of EDTA, and during 1 hour with citrate. Similar values of MPV under optimal conditions were obtained with blood from a second group of 100 healthy donors to determine reference ranges. These were 7.2-10.8 fL and 6.1-9.5 fL for EDTA- and citrate-anticoagulated blood samples, respectively. Accordingly, this pointed to lower MPV values of platelets in citrated whole blood.

In **chapter 3** also other pre-analytical factors that might influence platelet function analysis were under investigation. Platelet function measurements in blood samples can be influenced by residual coagulation, but how is not completely understood. We compared how the site of blood collection and the type of blood puncture could affect whole-blood platelet function, as determined by MEA and PFA-100. In addition, we determined whether contact activation of the coagulation system was of influence on these measurements in whole blood. Blood sampling from arterial or venous lines or by venipuncture gave similar results for MEA and PFA-100 assays. Contact activation was always detectable, but did not appear to influence the test outcomes. It is concluded that, for platelet function analysis, blood can be collected from venous or arterial lines or by venipuncture.

Chapter 4 is devoted to practical questions: how to transport blood samples and blood products efficaciously and without damage through the hospital,

particularly in relation to point-of-care testing. This was determined by ROTEM, which was used as a whole blood point-of-care test measuring changes in coagulation and in fibrin clot formation. It generates results quickly and is theoretically useful for individualized guided hemostatic therapy. We considered that a centralized use of this method in one location of the hospital may avoid non-expert handling, and therefore investigated the possibility of sending blood samples to this central place through a pneumatic tube system (PTS). The study in **chapter 4a** aimed to evaluate the influence of PTS transport of blood samples on fibrin clot formation and thrombin generation triggered by tissue factor or contact activation. The results indicated that whole-blood samples can indeed be sent by PTS for valid ROTEM analysis. Transport via PTS did not result in a measurable increase in contact activation. Given that many hospitals have different types of PTS, the present findings may not be valid for all hospitals.

In **chapter 4b** the feasibility of platelet concentrate transport in a pneumatic system was under investigation. Again, it was considered that the use of PTS for transport of blood samples in hospitals reduces the workload and turnaround time of test results. PTS may also be used for the transport of blood products for transfusion purposes, but this has not sufficiently been investigated. In this paper, platelet functionality was investigated after single or multiple transports via PTS of platelet concentrates (non-irradiated or irradiated), in comparison to storage of the concentrates. Before and after transport, we measured platelet count, platelet metabolic markers, optical aggregation, impedance aggregation, P-selectin (CD62P) expression, and microparticle formation. We found that platelet metabolic markers changed as a result of sample storage, but not by using PTS. Platelet function markers were for the major part not different in concentrates sent by PTS. This work shows that PTS transport of platelet concentrates from the laboratory to the operation theatre is possible without detectable loss in platelet function.

Chapter 5a gives a comprehensive description of current treatment options for obstetric patients presenting with periparturient bleeding. A special focus of this review was to determine the potential of treatment guided by point-of-care devices (rotational thromboelastometry). Worldwide, postpartum hemorrhage is the leading cause of maternal morbidity and mortality. Commonly, however, medical and transfusion therapy is not based on the actual coagulant state, because conventional laboratory test results are not available within 45-60 minutes. Literature analysis

indicated a good correlation between thromboelastometric assays and classic coagulation times. Dilution of the blood, particularly after transfusion with colloid fluids, appears to influence the coagulation tests. Fibrinogen in plasma seems to play a major role in the course of postpartum hemorrhage, and its lowering can be an early predictor of the severity of postpartum hemorrhage. The ROTEM value (measured as FIBTEM, assessing fibrin polymerization) appears to decline even sooner than the fibrinogen level and, hence, might be useful for early guidance of interventions. Data on TEM and ROTEM measurements in blood from pregnant women are limited, particularly during the peripartum period and in postpartum hemorrhage. So more research in this field is needed.

Chapter 5b gives a clinical example of the potential advantages in predicting the bleeding risk in an obstetric patient suffering from HELLP syndrome by way of adequate platelet function analysis. We present a case of a primigravid woman developing HELLP syndrome at 29 weeks and 6 days. Platelet function was assessed by MEA and PFA-100. In addition, platelet count and MPV were monitored over an eleven days period. The results suggested that the outcome parameters of MPV and PFA-100 are better predictors for platelet function than platelet count. Implementation of these tools might improve decision-making and treatment in patients during delivery.

In **chapter 6a** the effects of hemorrhage and hemodilution on thrombin generation and fibrin clot formation assessed by thromboelastometry in three different patient groups: patients on vitamin K antagonists (n=10); and cardiopulmonary bypass patients with no major bleeding (n=30) and with risk of major bleeding (n=58). Treatment with vitamin K antagonists led to a progressive reduction in thrombin generation, but not in fibrin clot formation. In patients with no major bleeding, plasma factor levels post-surgery were 53-60% of normal. This was accompanied by a moderate reduction in both hemostatic processes. In plasmas from (bleeding) patients undergoing major surgery, factor levels were 38-41% of normal, and these levels increased after plasma transfusion. Taking preset threshold values for normal thrombin generation and fibrin clot formation, at least one process was low in 88-93% of the patients with (persistent) bleeding, but only in 40-53% of the patients without bleeding. The processes of thrombin generation and fibrin clot formation were independently reduced in acquired dilutional coagulopathy, while minimal levels of both appeared to be required for adequate hemostasis.

This leads to **chapter 6b** where a treatment strategy (addition of fibrinogen concentrate to the transfusion products) was prospectively studied in a population suffering from massive hemorrhage due to major elective surgery. It could be shown that 2 grams of fibrinogen concentrate will result in better coagulation parameters when assessed by thrombin generation measurement and ROTEM analysis. However, this does not translate into clinical improvement of hemostasis. The results suggest that the amount of fibrinogen has to be adjusted to show also clinical enhancement of the coagulation.

In **chapter 7** the results from all of these investigations are put into the context of optimized patient care as a circle of improvement in bleeding management, with a focus on future developments.

Samenvatting

Hoofdstuk 1 geeft een historisch overzicht van bijzondere ontwikkelingen op het gebied van hemostase-testen. De focus ligt op drie soorten van zogenaamde screenings hemostase-testen in zowel plasma als volbloed, die een bloedingsrisico kunnen voorspellen en eventuele verworven stollingsstoornissen kunnen monitoren. De eerste categorie bevat screenings testen, die de kinetiek van plasmatische stolling onderzoeken: de protrombinetijd (PT), de geactiveerde partiële trombinetijd (aPTT) en kinetische analyse van de trombinegeneratie. In het verleden werden de PT en aPTT ontwikkeld tijdens onderzoek naar stollingsmechanismen. Later zijn deze testen wereldwijd gestandaardiseerd voor het opsporen van stollingsfactor deficiënties en voor het monitoren van therapeutische antistolling met vitamine-K antagonisten of ongefractioneerd heparine. De eerste stappen naar een trombinegeneratietest werden reeds in 1953 gezet. De huidige methoden, ontwikkeld in Maastricht, meten adequaat de totale hoeveelheid van trombinegeneratie in plasma. Voordat deze techniek breed in de dagelijkse klinische praktijk kan worden ingezet, dient nog (pre)analytische standaardisatie gedaan te worden. De tweede categorie van screenings-testen richt zich op het meten van de stollingscapaciteit in volbloed door middel van viscoelasticiteitsmeting bij de vorming van een fibrinestolsel. Veel gebruikte viscoelasticiteitstesten zijn tromboelastastografie (TEG) en rotatietromboelastometrie (ROTEM). De eerste viscoelastische volbloedtesten zijn in 1948 ontwikkeld. Recentelijk wordt deze methode weer veel gebruikt, en staat bekend als dé point-of-care-test voor snelle diagnose van bloedingsproblemen. De derde relevante groep testen analyseert de plaatjesfunctie in plasma of volbloed. Dit betreft de *platelet function analyser-100* (PFA-100) en de *multiple electrode impedance aggregometry* (MEA). Deze snel uit te voeren testen zijn belangrijk, omdat steeds meer patiënten in de perioperatieve fase plaatjesremmers gebruiken. Het algemeen **oogmerk** van dit proefschrift is te komen tot een beter functionerende kwaliteitscirkel bij het management van bloedingen in het ziekenhuis. Deze kwaliteitsverbetering behelst een nauwe samenwerking tussen zorgverleners en het ziekenhuislaboratorium om de behandeling van bloedingen continu te verbeteren. Wij onderzochten hoe door middel van geschikte laboratoriumtesten de diagnose van een gegeven patiënt verbeterd kan worden, voor het stelpen van bloedingen. Daarnaast onderzochten wij ook hoe een patiëntgeoriënteerd therapieplan kan worden opgesteld teneinde een bloeding vroegtijdig te stoppen.

Hoofdstuk 2 beschrijft de precieze analytische condities bij bepaling van het *mean platelet volume* (MPV). Dit is belangrijk, omdat in verschillende artikelen het MPV als biomarker voor reactiviteit van bloedplaatjes - en zo als onafhankelijke risicofactor voor hart- en vaatziekten - beschrijven. Dit vereist een betrouwbare controle van de pre-analytische factoren van de MPV-meting en vraagt om een degelijke standaardisatie.

Het overzicht in **hoofdstuk 2a** benadrukt de hoge variabiliteit binnen de literatuur, welke MPV als plaatjesfunctie marker in hart- en vaatziekten beschrijft. Voorts geeft het een diepgaander inzicht in de methodieken en de voor- en nadelen behorend bij het meten van MPV. De literatuur bericht meermaals dat waarden van het MPV afhankelijk zijn van het gebruikte anticoagulans en van het meetmoment. Daarom is een standaardisatie van de laboratoriummethoden voor deze parameter belangrijk. Een doeltreffende methode is de geautomatiseerde impedantietechniek, die voor de telling van bloedcellen wordt gebruikt. Deze techniek geeft tevens routinematig informatie over het MPV, en kan gestandaardiseerd worden.

In het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 2b** is getracht tot standaardisatie te komen van de bepaling van MPV. Hiertoe werd bloed van 20 vrijwilligers in kalium-EDTA en in natrium-citraat verzameld en werd het plaatjesaantal en het MPV elk half uur in de monsters gemeten. De citraatmonsters lieten een significant lagere MPV zien dan de EDTA-monsters. Verder bleek de MPV in EDTA-monsters gedurende 2 uren en die in citraatmonsters gedurende 1 uur te stijgen. Rekening houdend met deze resultaten werd in een tweede groep van 100 gezonde bloeddonoren de referentiewaarde bepaald. Deze ligt voor EDTA-monsters tussen 7,2 en 10,8 fl en voor citraatmonsters tussen 6,1 en 9,5 fl, daarmee benadrukkend de lagere MPV voor citraatmonsters.

In **hoofdstuk 3** zijn enige pre-analytische factoren onderzocht, welke van invloed op de plaatjesfunctietesten kunnen zijn. Het meten van deze functie in bloedmonsters kan zijn verstoord door restactiviteit van de stolling, maar het precieze mechanisme hiervan was onbekend. Wij vergeleken het effect van de plaats van bloedafname en de manier van bloedprikken op plaatjesfunctiemetingen in volbloed, geanalyseerd met de MEA en de PFA-100. Verder onderzochten wij of contactactivering van het stollingssysteem een rol speelt bij deze metingen. Bloedmonsters afgenomen via een arteriële of veneuze lijn, of door middel van een armprik gaven vergelijkbare resultaten met MEA en PFA-100. Ondanks het feit dat contactactivering altijd

aanwezig was, kon er geen effect op de plaatjesfunctie worden aangetoond. Hieruit kan geconcludeerd worden dat monsters voor betrouwbare plaatjesfunctie-analyse zowel uit een arteriële als veneuze lijn of via venapunctie uit de arm afgenomen mogen worden.

Hoofdstuk 4 betreft praktische vraagstellingen, zoals op welke wijze bloedmonsters en bloedproducten voor *point-of-care*-testen efficiënt en zonder beschadiging binnen het ziekenhuis getransporteerd kunnen worden. Dit werd geëvalueerd met behulp van de ROTEM als volbloed-test, waarmee veranderingen in de stolling en de fibrinestolselvorming te meten zijn. Deze test geeft snel resultaten en is in theorie handig ten behoeve van geïndividualiseerde hemostase-therapie. Bij voorkeur wordt een dergelijke test uitgevoerd op een centrale locatie in het ziekenhuis, waar ervaren medisch analisten de metingen verrichten. Daarom onderzochten wij de mogelijkheden om de bloedmonsters met de buizenpost te sturen. De studie in **hoofdstuk 4a** evalueerde de invloed van buizenposttransport op de kwaliteit van de monsters met betrekking tot fibrinestolselvorming en trombinegeneratie ten gevolg van contactactivatie. Uit de resultaten blijkt dat bloedmonsters welke met behulp van de buizenpost verzonden worden een nauwkeurige ROTEM-analyse toelaten. Verder werd er geen contactactivatie gevonden. Gezien het feit dat het buizenpost systeem per ziekenhuis verschilt zijn onze resultaten wellicht niet naar elk ziekenhuis te vertalen.

In **hoofdstuk 4b** werd de mogelijkheid onderzocht om plaatjesconcentraten met de buizenpost te verzenden, met als voordeel een sneller transport. In deze studie werd de plaatjesaggregatie na enkele of meerdere transporten van plaatjesconcentraten (bestraald of niet-bestraald) middels de buizenpost bekeken in vergelijking met de opslagtijd van de plaatjes. Voor en na het transport werden plaatjesaantal, metabole markers van plaatjesactiviteit, optische en impedantie-aggregometrie, P-selectine (CD62P) -expressie en microparticle-vorming gemeten. De metabole markers van de plaatjes veranderden ten gevolg van een langere opslagtijd, maar niet door buizenpost transport. De meeste markers voor plaatjesfunctie waren niet gewijzigd in de concentraten welke middels buizenpost getransporteerd waren. Deze studie toont daarmee aan dat transport van plaatjesconcentraten via buizenpost zonder meetbaar functieverlies van de plaatjes mogelijk is.

Hoofdstuk 5a geeft een uitgebreide beschrijving van de huidige behandeling van obstetrische patiënten met een post-partale bloeding. De focus van deze review

betreft de vraag naar de potentiële voordelen van een *point-of-care* (ROTEM/TEG) behandelingsstrategie van deze patiëntengroep. Wereldwijd draagt post-partale bloeding aanzienlijk bij aan mortaliteit en morbiditeit. Omdat de conventionele stollingstesten (PT, aPTT) niet binnen 45-60 minuten beschikbaar zijn, is de behandeling van deze bloedingen vaak niet gebaseerd op kennis van de stolling. Uit de literatuur blijkt er een goede correlatie te zijn van tromboelastometrische testen en de conventionele stollingstesten. Bloedverdunding met infuusvloeistoffen, in het bijzonder colloïdale vloeistoffen, blijkt de stollingstesten te beïnvloeden. Bij het optreden van post-partale bloedingen blijkt het fibrinogeengehalte in plasma een grote rol te spelen. Een verlaging van dit gehalte wordt als predictor van de ernst van een bloeding gezien. De ROTEM assay (vooral de FIBTEM test, die de polymerisatie van fibrine meet) zakt eerder dan het gemeten fibrinogeengehalte en kan zo van belang zijn bij het vroegtijdig beslissen tot een interventie. Data van de TEG en de ROTEM testen bij zwangere patiënten, in het bijzonder rondom de bevalling en bij post-partale bloeding zijn schaars. Daarom is er op dit gebied meer onderzoek nodig.

Hoofdstuk 5b laat zien aan de hand van een casus van een patiënt met HELLP syndroom, hoe adequate plaatjesfunctietesten de kans op bloedingsproblemen kunnen voorspellen. De casus beschrijft een primigravida die een HELLP syndroom ontwikkelt na 29 weken en 6 dagen. Plaatjesfunctie werd gemeten met behulp van MEA en PFA-100. Bovendien werd het plaatjesaantal en het MPV over een periode van 11 dagen gemonitord. De resultaten suggereren dat zowel de MPV- als de PFA-100-metingen een betere maat zijn voor de bepaling van plaatjesfunctie zijn dan het plaatjesaantal. Een introductie van deze testen zou de besluitvorming en behandeling rondom de bevalling kunnen verbeteren.

In **hoofdstuk 6a** zijn de gevolgen van bloedverdunding op de trombinegeneratie en fibrinestolselvorming met behulp van tromboelastometrie onderzocht bij drie patiëntengroepen: patiënten onder behandeling van vitamine-K antagonisten (n=10), patiënten die een operatie met cardiopulmonale bypass ondergingen zonder ernstige bloeding (n=30), en patiënten met risico op ernstige bloedingen (n=58). Hierbij toonden de patiënten die behandeld waren met vitamine K een progressieve daling in trombinegeneratie. Plasma van deze patiënten liet echter geen duidelijke verandering in de fibrinestolselvorming zien. Anderzijds waren in plasma van patiënten zonder ernstige bloedingen de stollingsfactrorspiegels gereduceerd (53-60%). Dit ging samen met een verminderde functie van beide genoemde

hemostasetesten. In plasma van patiënten die majeure chirurgie ondergingen en een bloedingsneiging hadden, waren de factorspiegels gedaald tot 38-41% van normaal, en namen deze na plasmatransfusie toe. Op basis van vastgestelde randwaarden voor een normale trombinegeneratie en fibrinestolselvorming, bleek dat 88-93% van de patiënten met (aanhoudende) bloedingen lager scoorde in één van beide testen, en slechts 40-53% van de patiënten zonder bloedingen. De processen van trombinegeneratie en fibrinestolselvorming bleken onafhankelijk gereduceerd bij verworven verdunningscoagulopathieën, terwijl minimale activiteit van beide testen nodig was voor een toereikende hemostase.

Dit leidt naar **hoofdstuk 6b**, waar een behandelingsstrategie van bloedplasma al dan niet gedeeltelijk vervangen door fibrinogeenconcentraat prospectief bestudeerd werd bij patiënten die ten gevolg van majeure electieve chirurgie massale bloedingen vertonen. Aangetoond werd dat de vervanging door fibrinogeenconcentraat tot betere resultaten leidde bij de trombinegeneratie en ROTEM-analyses. Er bleek echter geen verbetering te zijn in de klinische situatie. De resultaten suggereren dat de hoeveelheid van fibrinogeen verhoogd dient te worden om een klinisch effect van verbeterde hemostase teweeg te brengen.

In **hoofdstuk 7** zijn de resultaten van alle onderzoeken binnen de context van een optimale behandelingsstrategie van de patiënt geplaatst. Deze is gezien als een cirkel waarin de verbetering van bloedingsmanagement een centraal punt in neemt, dit ook met het oog op toekomstige ontwikkelingen.